



TITLE:

核膜孔複合体内部における選択的
バリアの構造・機能解析(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

小西, 秀明

CITATION:

小西, 秀明. 核膜孔複合体内部における選択的バリアの構造・機能解析.
京都大学, 2018, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21226>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	小西 秀明
論文題目	核膜孔複合体内部における選択的バリアの構造・機能解析		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>核膜孔複合体（Nuclear Pore Complex, NPC）は、細胞質-核質間の物質輸送を司る重要な細胞内器官で、Nucleoporin (Nup)と呼ばれるサブユニットから構成される。核膜孔内部を構成するNupは、長い非構造領域を持ち、フェニルアラニン（F）やグリシン（G）といった疎水性アミノ酸に富むFGモチーフを多く含むため、特にFG-Nupと呼ばれている。FG-Nupは、孔内部に高度に混み合った疎水的な分子クラウディング環境、および網目構造を形成し、大きさで通過分子を選別する分子ふるいのような「選択的バリア」の役割を担っていると考えられているが、実際の核膜孔内部でそのようなクラウディングがどのような空間分布をしているかは依然として不明である。そこで本論文では、1) FG-Nupによる分子クラウディングが孔内部にいかに関空間的に分布しているか、2) Nup以外に、孔内部にクラウディングを形成する要素があるか、3) 核膜孔内部の分子クラウディングがどのような過程を経て形成されるのか、という問題に取り組んだ。</p> <p>クラウディング感受性蛍光タンパク質「YFP1G」を用いたFRETプローブ（GimRET）をNupと融合させて培養細胞に発現させ、核膜孔内部における分子クラウディングの定量を行った。詳細な蛍光シグナルの定量解析から、間期における核膜孔の細胞質側と核質側における環境は、孔中央部と比較すると非常に強い分子クラウディング「Protein-rich domain」を形成することが分かった。また、digitoninで細胞質を除去した細胞を用いた<i>in vitro</i>での解析からは、多くの細胞質タンパク質が核膜孔内部に存在し、クラウディング形成に寄与していること、ii) Protein-rich domainは細胞質・核質側のFG-Nupらが主に形成していること、またiii) 輸送因子であるimportin β自身は、孔内部のクラウディングに影響を与えないことが明らかになった。最後に、同じプローブを用いて生細胞経時観察を行い、細胞分裂後期における核膜孔再構築段階のProtein-rich domainの形成過程を調べたところ、Protein-rich domainは核質側と細胞質側で独立して形成されることなどが明らかになった。これらの結果から、核膜孔の形成過程においては、構造化したタンパク質同士の立体特異的な相互作用のみならず、分子クラウディング環境中における非構造タンパク質間の弱い相互作用も重要であることが示唆された。これらの成果から、分子クラウディング環境中における非構造タンパク質の相互作用に基づく新しい核膜孔内部構造の再構築モデルを提唱した。以上の成果は、核膜孔内部構造に関する研究のみならず、物質輸送や核膜孔再構築の研究に新たな知見を与えるものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本申請論文は、分子クラウディングに感受性を示す蛍光タンパク質プローブを用いて、生細胞内における局所的タンパク質クラウディングの時空間的定量解析を行い、核膜孔複合体内部の構造的基盤を明らかにした内容である。核膜孔複合体は、30種以上のサブユニットから構成される総分子量120MDaの巨大な機能性タンパク質複合体であり、細胞質と核質との間の物質輸送を一手に担う重要な分子である。その分子透過性は、他のどの輸送体とも大きく異なり、カリオフェリンなどの輸送担体を選択的に通過させる一方で、小さい分子ほど通過しやすいという「分子ふるい」としての機能的側面も併せ持つ。カリオフェリン依存的な分子運搬のメカニズムに関しては、これまでに多くの研究が行われてきたが、核膜孔複合体の構造そのものに関しては、その巨大な構造のため、まだ不明な部分が多い。孔を支える外殻の構造に関しては、電子線トモグラフィー等の技術の進歩により、近年解明が進んだが、分子が通過する孔中心部に関しては、非構造タンパク質に富んだゲル状構造のため、構造解析は進んでいない。

このような状況で本論文は、核膜孔中心部のゲル状構造に着目し、各サブユニット周辺のタンパク質濃度（混雑度）を定量化することで、「分子ふるい」の性質を明らかにする試みを行った内容である。2015年に発表された分子クラウディングに感受性を示す蛍光タンパク質プローブ(GimRET)にいち早く着目し、これを、核膜孔を構成するサブユニット(nucleoporin)に繋いで培養細胞内に発現させることで、生きた細胞内における核膜孔内部のクラウディング定量に成功している。10個を超えるサブユニットで同様の実験を行うことで、核膜孔内部には、2つの空間的・機能的に独立した「分子ふるい」が存在していることを示唆するデータを得ている。この結果は、核膜孔内部の構造的性質に関する、これまでにない重要な知見を提供するものであり、核輸送に関する多くの先行研究の結果をうまく説明するものである。また、細胞分裂期での核膜孔再構築過程におけるサブユニット集合とクラウディング形成に関して詳細な時空間的解析を行い、その結果を元に、細胞内巨大分子複合体の構築に関する新しい分子メカニズムの提唱に成功している。

本申請論文は、生命科学に関する高度で幅広い学識、分子情報解析学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念が示されており、論理的かつ一貫性をもって記述されている。よって本論文を博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成30年1月22日に論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日